



Interacción de la proteína TcdE y la toxina B intracelular de genotipos epidémicos de *Clostridioides difficile*

Interaction of TcdE protein and intracellular toxin B of epidemic genotypes of *Clostridioides difficile*

Carlos Quesada-Gómez¹, Gabriela Jiménez-Hurtado¹

RESUMEN

Introducción: *Clostridioides difficile* es un bacilo anaerobio esporulado que provoca diarrea, especialmente en pacientes hospitalizados y bajo tratamiento antibiótico. Se destacan genotipos hipervirulentos como NAP1/RT027 y NAP1/RT019, asociados a brotes epidémicos globales debido a su capacidad de hiperproducción de toxinas y esporulación aumentada. **Objetivo:** Determinar si existe interacción bioquímica entre TcdE y TcdB intracelular y evaluar su posible papel en los mecanismos de secreción de toxinas en cepas epidémicas de *C. difficile*. **Metodología:** Lisados bacterianos de genotipos NAP1/RT027 y NAP1/RT019 fueron analizados por Western Blot. Se expresó y purificó TcdE de la cepa nativa o *wild type* (wt) en *E. coli* T7 lysY/Iq, luego se acopló a una matriz de sefarosa para ensayos de co-inmunoprecipitación con TcdB. La cepa ATCC® 700057 se utilizó como control. **Resultados:** TcdB intracelular fue detectada en genotipos hipervirulentos, pero no en la cepa control. La purificación de TcdE_{wt} fue exitosa, y aunque en las condiciones evaluadas no se observó co-inmunoprecipitación, se detectó una interacción leve entre TcdB intracelular y TcdE. **Conclusiones:** Se confirmó que las cepas epidémicas de *C. difficile* no solo producen más toxinas intracelularmente, sino que muestran una interacción leve con TcdE. Se propone ampliar el estudio a otras isoformas de TcdE y subtipos de TcdB para entender mejor sus roles en la secreción de toxinas.

Palabras clave: *Clostridioides difficile*, toxinas bacterianas, TcdE, TcdB

¹ Facultad de Microbiología y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad de Costa Rica

Recepción: 29/08/2024. Aceptación: 11/06/2025

Cómo citar este artículo: Quesada-Gómez C., Jiménez-Hurtado G. Interacción de la proteína TcdE y la toxina B intracelular de genotipos epidémicos de *Clostridioides difficile*. Hechos Microbiol. 2025;16(1): DOI: 10.17533/udea.hm.v16n1a03

ABSTRACT

Introduction: *Clostridioides difficile* is a spore-forming anaerobic bacillus that causes diarrhea, particularly in hospitalized patients undergoing antibiotic treatment. Hypervirulent genotypes such as NAP1/RT027 and NAP1/RT019 are prominent, as they are associated with global epidemic outbreaks due to their enhanced toxin production and increased sporulation capacity. **Objective:** To determine whether there is a biochemical interaction between TcdE and intracellular TcdB, and to assess its potential role in the mechanisms of toxin secretion in epidemic *C. difficile* strains. **Methodology:** Bacterial lysates from NAP1/RT027 and NAP1/RT019 genotypes were analyzed by Western blot. TcdE_wild type (wt) was expressed and purified in *E. coli* T7 lysY/Iq, then coupled to a Sepharose matrix for co-immunoprecipitation assays with TcdB. The ATCC® 700057 strain was used as a control. **Results:** Intracellular TcdB was detected in hypervirulent genotypes, but not in the control strain. TcdE_wt purification was successful, and although co-immunoprecipitation was not observed under the tested conditions, a weak interaction between intracellular TcdB and TcdE was detected. **Conclusions:** The study confirms that epidemic *C. difficile* strains not only produce higher levels of intracellular toxins but also exhibit a weak interaction with TcdE. Further studies using other TcdE isoforms and TcdB subtypes are recommended to better understand their roles in toxin secretion.

Keywords: *Clostridioides difficile*, bacterial toxins, TcdE, TcdB

Introducción

Clostridioides difficile es un bacilo Grampositivo anaerobio esporulado, una de las principales causas de diarrea asociada a antibióticos. La alteración de la microbiota intestinal facilita su colonización y producción de toxinas, llevando desde diarrea hasta colitis pseudomembranosa. Los genes *tcdA* y *tcdB*, ubicados en el PaLoc (19,6 Kb), codifican las toxinas A y B. Este locus también contiene los reguladores transcripcionales *tcdC* (negativo), *tcdR* (positivo) y *tcdE*, que codifica TcdE, una proteína holina (~19 kDa, 166 aa,

3 dominios transmembrana) similar a las holinas clase I y relacionada en función con la secreción de toxinas sin causar lisis celular [1].

Los principales factores de virulencia son dos toxinas de naturaleza proteica, la toxina A (TcdA) y la toxina TcdB₂ (TcdB). Todos estos genes *tcdE*, *tcdA* y *tcdB* se transcriben como un único transcrito policistrónico desde el mismo promotor PaLoc. Esto implica una coregulación coordinada de la síntesis de la holina y las toxinas, lo cual apoya la hipótesis de que TcdE facilita la secreción sistémica de TcdA y TcdB [2,3,4].

El gen *tcdE* codifica por una proteína de 166 aminoácidos y un peso molecular de 19 kDa. Esta proteína es altamente hidrofóbica y cuenta con tres dominios transmembrana [5]. Los hallazgos estructurales y similitudes en la estructura primaria de esta proteína sugieren que esta es semejante a las proteínas del grupo de holinas clase I; grupo al que, por ejemplo, pertenece la proteína S del bacteriófago Lambda [6].

Las holinas son proteínas pequeñas de bacteriófagos formadores de poros que median la lisis bacteriana durante muerte celular programada o posterior a la infección [7]. Forman parte de las estrategias que utilizan los virus para salir de las células hospederas una vez que se han replicado. Y se ha reportado que la secreción de TcdA y TcdB dependen de la presencia de TcdE [6,8]. Las holinas codificadas en el genoma de los bacteriófagos desencadenan eventos que culminan con lisis bacteriana y liberación de partículas virales; sin embargo, se ha demostrado que TcdE tiene en *C. difficile* una actividad semejante a holina sin producir lisis [6].

Aunque se ha evidenciado que TcdE es importante en la secreción de toxinas, se ha descartado que la eficiencia de secreción de toxinas o de esporulación dependan de TcdE [9]. En contraposición en otro estudio se mencionó que la liberación de las toxinas no depende de la lisis celular, sino de la expresión de la proteína TcdE. Para verificar si la reducción en la secreción de toxinas era atribuible a la ausencia de TcdE, se restauró la función del gen *tcdE* en la cepa mutante utilizando un plásmido funcional. Tras la complementación, se observó un aumento significativo en la secreción de las toxinas, lo que confirma que la recuperación de *tcdE* restauró la capacidad secretora [6]. En esta última publicación se atribuye la discrepancia de resultados con respecto a los obtenidos por Olling

et al., [9], cuyas condiciones experimentales y cepas utilizadas son diferentes y se trabaja en fases distintas de la curva de crecimiento bacteriano [6]. Otras investigaciones se fundamentan en que los genes *tcdE*, *tcdA* y *tcdB* se transcriben como un único transcrito policistrónico desde el mismo promotor PaLoc. Esto implica una co-regulación coordinada de la síntesis de la holina y las toxinas, lo cual apoya la hipótesis de que TcdE facilitaría la secreción sistémica de TcdA y TcdB [3,10]. Esto constituye un hallazgo que aporta evidencia a la teoría de la liberación de las toxinas de *C. difficile* por medio de este mecanismo [3].

Se han descrito distintos genotipos de *C. difficile* alrededor del mundo, y recientemente brotes epidémicos han sido atribuidos a cepas hipervirulentas. Entre las más relevantes, los ribotipos RT027 y RT019 se asocian a una mayor producción de toxinas, alta tasa de esporulación y resistencia a múltiples antibióticos, lo que representa una amenaza epidemiológica significativa y justifica estudios en su patogénesis. Una de estas cepas, NAP1/RT027, ha sido vinculada con el desarrollo de una mayor gravedad clínica e incidencia de recaídas [11,12,13].

Los mecanismos de la interacción de las toxinas de *C. difficile* con las proteínas involucradas en su secre-

ción no está completamente elucidada. Para verificar si la reducción en la secreción de toxinas era atribuible a la ausencia de TcdE, se restauró la función del gen *tcdE* en la cepa mutante; tras la complementación se observó un aumento significativo en la secreción de toxinas, confirmando que la recuperación de *tcdE* restauró la capacidad secretora [3]. El presente estudio analiza la interacción bioquímica entre TcdE (isoforma nativa) y TcdB intracelular en cepas epidémicas, buscando aportar evidencia sobre los mecanismos de secreción que aumentan el potencial patogénico de estos genotipos

Materiales y métodos

CEPAS DE *C. DIFFICILE*

Las cepas analizadas provienen de aislamientos clínicos durante brotes epidémicos en Costa Rica (Tabla 1), almacenadas a -80°C en BHI con 20 % glicerol. Como control negativo, se incluyó la cepa no toxigénica ATCC® 700057, para diferenciar señales de TcdB y validar la especificidad de los anticuerpos utilizados.

Tabla 1. Aislamientos clínicos y cepa control con sus respectivos genotipos

Cepa	Pulsotipo	SmaI-patrón	Ribotipo	MLST-ST	Perfil toxigénico
5758	NAP1	001	027	01	TcdA+/TcdB+/CDT+
5757	NAP1	279	019	67	TcdA+/TcdB+/CDT+
CD630			012	54	TcdA+/TcdB+/CDT-

OBTENCIÓN DE LISADOS CELULARES

Se realizaron lisados de las cepas bacterianas según la metodología anteriormente descrita [14]. Brevemente, cultivos bacterianos de 24 horas en 50 mL de caldo infusión cerebro-corazón (BHI) se centrifugaron a 20.130 g, durante 30 minutos y a una temperatura de 4°C . Seguidamente, se lavó tres veces el botón resultante con PBS 1X, luego se resuspendió en 10 mL de buffer de lisis (Tris-HCl 100mM a pH 6.8, 2% SDS, 23% de glicerol, 5 mg/mL de lisozima). La suspensión bacteriana obtenida se sometió a ebullición en por 20

minutos y el lisado bacteriano obtenido se centrifugó a 20.130 g durante 30 minutos y a 4°C para tratar de eliminar residuos de membrana y células no lisadas.

TRANSFORMACIÓN DE *E. COLI* T7 *lysY*/I^q CON PLÁSMIDOS PARA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE TcdE

Se siguió la metodología previamente descrita por Olling et al., [9]. Brevemente, el plásmido vector pQE30 que porta el gen de la isoforma nativa TcdE, denominada como TcdE_{wt} (gen *tcdE_{wt}*)

se transformó mediante choque térmico en la cepa de *Escherichia coli* de alta eficiencia T7 Express *lysY/I^q* (New England Biolabs®) con el genotipo: *MiniF lysY lacI^q(Cam^R) / fhuA2 LacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10—Tet^R)2[dcn] R(zgb-210::Tn10—Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr) 144::IS10*. El plásmido fue donado por Alexandra Olling de la Universidad de Hannover, Alemania.

Según las especificaciones del fabricante, los plásmidos pQE30 (Qiagen®) poseen un gen de β-lactamasa que le confiere, a las cepas bacterianas que lo adquieren, resistencia a la ampicilina. Después de la transformación del plásmido a la cepa *E. coli* T7 *lysY/I^q* se seleccionaron las colonias propagadas en agar Luria-Bertani (LB) con 100 mg/mL de ampicilina. Finalmente, se extrajo y purificó el ADN plasmídico (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen®), siguiendo las indicaciones del fabricante.

EXPRESIÓN DE TcdE EN *E. COLI* T7 *lysY/I^q*

Siguiendo la metodología previamente descrita se indujo la expresión de TcdE_{wt} a partir la cepa *E. coli* T7 *lysY/I^q* transformada [9]. Brevemente, la cepa se incubó 24 horas a 37 °C en medio LB. Después este tiempo se diluyó 1:20 caldo LB y se sometió a agitación de 200rpm a 37 °C hasta que la densidad óptica a 600 nm fuera 0.600. Para inducir la expresión de TcdE_{wt} se agregó 1mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se incubó durante 60 min a 37 °C. Luego, se centrifugó a 20.130 g durante 30 minutos a 4°C y entonces se descartó el sobrenadante y los pellets se concentraron con buffer NPI-10 (50mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol y 1mg/mL de lisozima, pH 8.0). La preparación anterior se incubó a 4°C por 10 minutos y se lisaron las células bacterianas por medio de sonicación con 4 ciclos de 60 segundos y 6 ciclos de 30 segundos a una amplitud de 50% (S-4000, Misonix®). Finalmente, el lisado fue sometido a filtración con poros de 0,2 μm de diámetro.

PURIFICACIÓN DE TcdE_{WT}

Siguiendo un protocolo recomendado por el fabricante, se purificó la proteína TcdE_{wt} con columnas Ni-NTA (Qiagen®). En resumen, la columna se equilibró con buffer NPI-10 y el lisado fue depositado a razón de 1 mL / 2 minutos. Seguidamente, se realizaron

lavados a la columna con el buffer NPI-50 (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 50mM imidazol, pH 8.0). Finalmente, se eluyó la columna con buffer NPI-250 (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250mM imidazol, pH 8.0). Para eliminar proteínas no unidas y otros interferentes, la columna utilizada en la purificación de proteínas se lavó 2 veces con buffer de lavado. Seguidamente, se eluyó la proteína con un buffer de elución con 250mM de imidazol.

Para evaluar la proteína purificada, se realizó una electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida de 12% y luego se transfirieron membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) para la detección por Western Blot (WB) con un anticuerpo policlonal de ratón Anti-TcdE (donado por Ralf Gerhard, Universidad de Hannover), seguido de anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado con peroxidasa (Life Technologies®) como anticuerpo secundario. Esta preparación fue revelada mediante una señal de quimioluminiscencia para lo que se empleó Lumi-Light^{PLUS} (Roche®) y el equipo ChemiDoc XRS (BioRad®), según las indicaciones de los fabricantes.

DETECCIÓN DE TcdB EN LOS LISADOS BACTERIANOS

Siguiendo el protocolo descrito anteriormente [14], las toxinas fueron detectadas en los lisados de las cepas de *C. difficile* empleadas en el estudio. Brevemente, las cepas fueron inoculadas en agar Brucella (BD BBL®) con 5% de sangre lisada de caballo (Oxoid®) e incubadas en anaerobiosis por 24 horas (90% N₂, 5%CO₂, 5%H₂, Bactron II ShellLab®). Después fueron inoculadas en caldo TYT [3% tripticasa peptona (BD BBL®)], 2% de extracto de levadura y 0,1% tioglicolato de sodio a pH 7.2 (Sigma®), para así tomar alícuotas y someterlas al buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM a pH 6.8, 2% SDS, 23% de glicerol) y finalmente obtener los lisados de las citoplasmáticos de las bacterias.

Estos los lisados se separaron mediante un SDS-PAGE con un gel de acrilamida al 7,5% y luego se transfirieron membranas de PVDF para la detección por WB de las toxinas mediante los anticuerpos monoclonales anti-TcdB (TGC-1, tgcBIOMICS®) y revelados con anti-IgG de ratón (Life Technologies®) conjugado con peroxidasa [15]. Como controles se emplearon los lisados bacterianos de la cepa no toxigénica de *C. difficile* (ATCC® 700057).

ACOPLE DE LA TcdE_{wt} A UNA MATRIZ DE SEFAROSA

Las proteínas TcdE_{wt} purificadas fueron unidas a soportes de epoxi-sefarosa activa (Sigma®), disolviéndolas en buffer de acoplamiento (0,1M NaHCO₃, 0,5M NaCl, pH 8,3) y luego expuestas a los soportes de sefarosa en agitación constante por un periodo de una hora. Luego esta mezcla fue transferida al buffer de bloqueo (0,1M Tris-HCl, pH 8,0) con el propósito de bloquear sitios activos residuales. Finalmente, se practicaron tres ciclos de lavado con alternaciones de pH con buffer de lavado (0,1M de ácido acético/acetato de sodio, 0,5M NaCl, pH 4,0) y del segundo buffer de lavado (0,1M Tris-HCl, 0,5M NaCl, pH 8).

Para comprobar el acople de TcdE_{wt} a la matriz de Sefarosa, se realizó un ensayo de WB en membranas de PVDF. Con la Sefarosa acoplada, se emplearon condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR), para R se calentó la sefarosa+TcdE a ebullición en buffer de carga con mercaptoetanol (0,1M Tris-HCl pH 6,8, SDS 10%, 87% glicerol, 10% β-mercaptoetanol, 2% azul de bromofenol) por un periodo de 5 minutos [16]. Por su parte, para las condiciones NR únicamente se mezcló la Sefarosa acoplada con el buffer de carga con mercaptoetanol. El anticuerpo primario utilizado fue un anti-TcdE policlonal generado en conejo seguido de anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado con peroxidasa y revelado mediante quimioluminiscencia, como se indicó anteriormente.

CO-INMUNOPRECIPITACIÓN (Co-IP) PARA LA DETECCIÓN DE INTERACCIÓN DE TcdE_{wt} Y TcdB

La preparación de TcdE_{wt} acoplada a la matriz de sefarosa se depositó en buffer Tris-HCl con IGEPAL (100mM Tris-HCl pH 7,4; 300mM NaCl; 2% IGEPAL, 2 mM EDTA), luego se añadió 350 µg de proteínas de los respectivos lisados bacterianos. Esta reacción se incubó en agitación a 25°C durante una hora. Después de este tiempo, la preparación fue centrifugada y el precipitado fue lavado con buffer de lavado (50mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% IGEPAL y 1 mM de EDTA). Seguidamente, se removió el sobrenadante y el pellet resultante se agregó a buffer de lisis de SDS-PAGE con mercaptoetanol y se calentó en ebullición por 5 minutos para ser transferido a una membrada PDVF y realizar el WB para la detección de TcdB en las condiciones especificadas anteriormente. Como controles se determinó la presencia de

TcdE posterior al ensayo de Co-IP en condiciones no reductoras y reductoras mediante la aplicación de ditioneitol, mercaptoetanol y calor (100°C). Adicionalmente, se incluyó en el ensayo de Co-IP con TcdB purificada de la cepa del genotipo NAP1/RT027/ST01. Como control se enfrentó 150 ng de esta TcdB a la sefarosa acoplada a TcdE_{wt} y se reveló con las mismas condiciones del WB anteriormente descritas.

Resultados

DETERMINACIÓN DEL PATRÓN PROTEICO DE LOS LISADOS BACTERIANOS

Se realizó la lisis de las cepas 5757 (NAP1/RT029/ST37), 5758 (NAP1/RT027/ST01) y CD630 para la comparación de los patrones intracelulares de proteínas. En el análisis de la electroforesis SDS-PAGE se mostró que las cepas presentan un patrón de bandas similares (Fig. 1), a pesar de pertenecer a genotipos distintos.

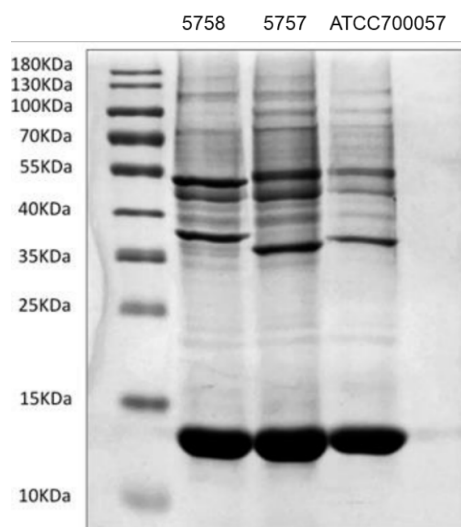


Figura 1. Lisados de cada cepa de *C. difficile*. Cada una fue tratada con buffer de lisis a partir de un cultivo de BHI en condiciones anaerobias. Las bandas de proteínas obtenidas fueron resueltas en un SDS-PAGE y teñidas con colorante de Coomassie.

PRESENCIA DE LA PROTEÍNA TcdB EN LISADOS DE NAP1/RT027 (5758) Y NAP1/RT019 (5757)

En los lisados de NAP1/RT027 y NAP1/RT019 se detectó TcdB, mientras que en la cepa control (ATCC 700057) no se observó señal, confirmando

una mayor producción intracelular en las cepas epidémicas (Fig. 2).



Figura 2. Detección de TcdB en lisados bacterianos de *C. difficile*. Lisados separados en un SDS-PAGE y transferidos a una membrana PVDF fueron identificados con un anticuerpo de ratón anti-TcdB y revelado con un anti-ratón-HRP. Un μg de TcdB purificada de NAP1/RT027 fue utilizada como control positivo.

EXPRESIÓN DE TcdE_WT RECOMBINANTE

TcdE_wt fue expresada y purificada mediante Ni-NTA. En SDS-PAGE se observó una banda principal de ~ 19 kDa y otras más tenues, compatibles con oligómeros o fragmentos. El Western Blot tras acople mostró señal fuerte en condiciones reductoras y no reductoras, confirmando un acoplamiento estable a la matriz (Fig. 3).

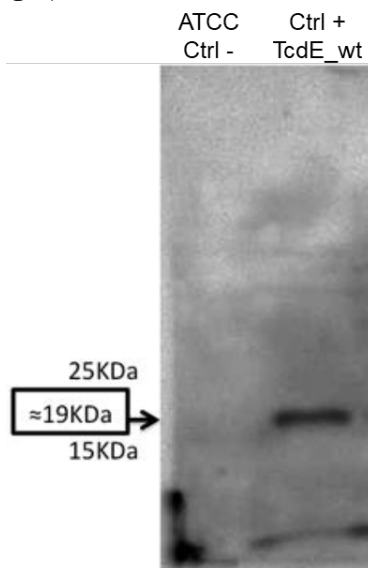


Figura 3. Detección de TcdE_wt por WB en purificaciones de proteínas expresadas heterológicamente en *E. coli* T7 transformada con un plásmido que codifica para la proteína TcdE_wt con un peso esperado 19 kDa. Las fracciones purificadas fueron separadas en un SDS-PAGE y transferidas a una membrana de PVDF. Posteriormente, se utilizó un anticuerpo anti-TcdE y revelado con un anticuerpo anti-conejo-HRP. Como control negativo fueron empleadas las fracciones secretadas del vector *E. coli* T7 no transformado.

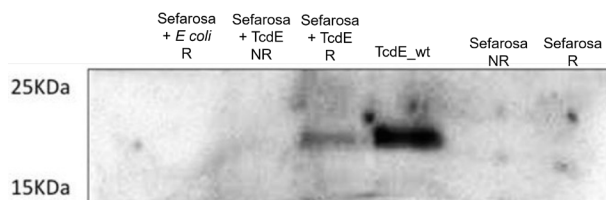


Figura 4. Control de acople de TcdE a la matriz de Sefarosa. Se trabajó en condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR). Sefarosa acoplada a la proteína TcdE y solo Sefarosa fueron resueltas SDS-PAGE en condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR). Las proteínas obtenidas fueron transferidas a una membrana de PVDF, tratadas con un anticuerpo anti-TcdE y reveladas con anticuerpo anti-conejo-HRP. Como controles se utilizó la fracción purificada de la isoforma TcdE_wt. y las fracciones secretadas del vector *E. coli* T7 no transformado enfrentadas a la seforosa-TcdE_wt.

INTERACCIÓN ENTRE LAS TOXINAS DE LOS LISADOS Y LA ISOFORMA TcdE_WT

En las condiciones evaluadas, no se observó una coimmunoprecipitación fuerte entre TcdE y TcdB, pero se evidencia una interacción leve, lo que sugiere una unión parcial entre ambas proteínas en estas cepas. Estos resultados sugieren que no existe una interacción bioquímica entre ambas proteínas o bien esta podría ser leve. Adicionalmente, después del ensayo de la Co-IP se evidenció la presencia de la proteína TcdE en las matrices de Sefarosa empleadas en el ensayo de la interacción de proteínas (Fig. 5). Subsecuentemente, se encontró que después del ensayo de Co-IP la proteína TcdE_wt aún continuaba acoplada a la matriz de Sefarosa y que los lisados bacterianos aún era detectable es misma proteína (Fig. 6).

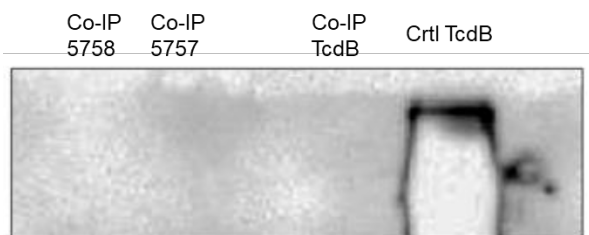


Figura 5. Detección de toxina TcdB de *C. difficile* en un ensayo de co-inmunoprecipitación con la proteína TcdE acoplada a una matriz de Sefarosa. Los ensayos de co-inmunoprecipitación se sometieron a una electroforesis SDS-PAGE y posteriormente fueron transferidos a una membrana de PVDF; posteriormente se trataron con el anticuerpo anti-TcdE y se reveló con un anticuerpo anti-conejo-HRP. Como

control positivo se utilizó 1µg de TcdB purificada de la cepa NAP1/RT027.

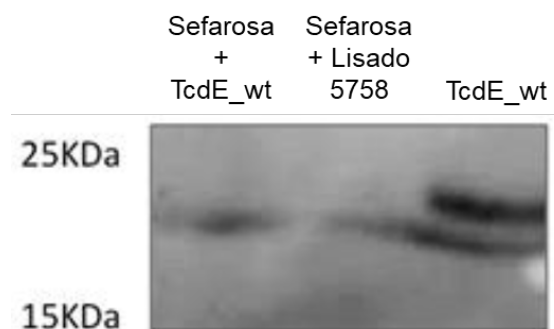


Figura 6. Control de la presencia de TcdE_wt en las columnas de Sefarosa posterior al tratamiento de co-inmunoprecipitación. La proteína TcdE_wt acoplada a la matriz de Sefarosa y el ensayo de co-inmunoprecipitación se resolvieron en un SDS-PAGE en condiciones reductoras. Luego, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF, tratadas con anticuerpo anti-TcdE y reveladas con anticuerpo anti-conejo-HRP.

Discusión

C. difficile posee dos toxinas de origen proteico que son sus principales factores de virulencia. Algunas de las evidencias sugieren que la proteína tipo TcdE juega un papel importante en la secreción de las toxinas A y B de *C. difficile* [6]; sin embargo, los mecanismos por el cual estas toxinas son secretadas por TcdE aún no están completamente claros [3]. En esta investigación se confirmó la presencia intracelular de la toxina TcdB en lisados de cepas de *C. difficile* pertenecientes a los genotipos epidémicos NAP1/RT027 y NAP1/RT019, mientras que no se detectó en la cepa de referencia ATCC® 700057. Este hallazgo refuerza la evidencia previa que indica que estas cepas hipervirulentas no solo producen mayores cantidades de toxinas extracelulares, sino que también acumulan cantidades significativas de toxinas en el citoplasma. Esta acumulación intracelular sugiere un mecanismo de producción y almacenamiento más activo, el cual podría estar vinculado con su alta virulencia y capacidad de diseminación en entornos hospitalarios. La presencia intracelular de TcdB valida la hipótesis de que parte de la toxina es retenida temporalmente antes de su secreción, y que su liberación puede estar mediada por proteínas específicas como TcdE [17].

Respecto a la expresión y purificación de la proteína recombinante TcdE_wt, si bien se logró obtener una fracción purificada con señales detectables mediante Western Blot, la intensidad de la señal fue tenue y no robusta en todas las condiciones. Esta baja intensidad podría estar relacionada con un nivel bajo de expresión, posible proteólisis durante la purificación, o plegamiento incompleto de la proteína recombinante. A pesar de esto, el acoplamiento de TcdE_wt a la matriz de Sefarosa fue evidente, como lo evidenció la estabilidad de la proteína bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras, lo que indica que la proteína retiene sus propiedades de unión tras el proceso de inmovilización [18]. Este aspecto metodológico es de gran relevancia, ya que permitió realizar ensayos de co-inmunoprecipitación con condiciones controladas y reproducibles [19].

Con respecto a la detección intracelular de las toxinas de *C. difficile*, se observó que la toxina B es detectable en los lisados de NAP1 y no en los lisados de la cepa control. Lo anterior confirma que las cepas NAP1 son hiperproductoras de toxinas e indica que éstas se acumulan en el citoplasma para luego ser secretadas o bien, en las condiciones de experimentación, en congruencia con los reportado anteriormente [13,14]. Adicionalmente, la hipersecreción de las toxinas en los genotipos hipervirulentos también se podría asociar, no solo a TcdE, sino también a que exhiben una incrementada eficiencia en el autoprocesamiento [15].

En cuanto a la interacción entre TcdE y TcdB, los ensayos de co-inmunoprecipitación realizados en este estudio no demostraron una interacción fuerte entre ambas proteínas. Sin embargo, se observó una señal leve que sugiere la posibilidad de una interacción transitoria o de baja afinidad. Esta interacción débil podría deberse a varias razones: i) la necesidad de cofactores o proteínas accesorias que estabilicen el complejo, ii) diferencias conformacionales entre las isoformas de TcdE o TcdB utilizadas, o bien a iii) limitaciones inherentes al sistema *in vitro* empleado. Es importante señalar que el ensayo de co-inmunoprecipitación en ausencia de membranas bacterianas nativas podría limitar el entorno estructural y electroquímico necesario para una interacción eficaz. Además, el gen *tcdE* posee múltiples codones de inicio de traducción, lo que da lugar a la expresión de tres isoformas distintas

de TcdE; en este estudio se utilizó la isoforma silvestre principal, por lo que no puede descartarse que otras isoformas tengan una mayor capacidad de interacción con TcdB. De igual forma, se ha descrito una importante diversidad estructural entre subtipos de TcdB, con al menos doce variantes conocidas, algunas de las cuales presentan modificaciones que podrían influir directamente en su afinidad por proteínas accesorias como TcdE [16,17].

Para determinar si el acople de la proteína TcdE a la Sefarosa había sido adecuado, se realizó un Western Blot para detectar la proteína TcdE. Se trabajó tanto en condiciones reductoras como en condiciones no reductoras, y se evidenció que el mercaptoetanol por sí solo no fue capaz de romper todos los enlaces disulfuro de las proteínas, y es por esto requiere de un tratamiento térmico que potencie la reducción de estos enlaces y la ruptura de las proteínas complejas. En este caso, el efecto de las condiciones reductoras se evidencia en la separación de la proteína TcdE de la matriz de Sefarosa.

Con respecto a los ensayos de inmunoprecipitación, no se encontró una interacción entre las proteínas TcdB y TcdE. Además, en uno de los controles realizados se evidenció que no existe algún tipo de inhibidor o interferente considerable en el ensayo de Co-IP que afecte la estabilidad de la proteína TcdE unida a la matriz de Sefarosa. Sin embargo, se debe considerar que han sido reportadas otras isoformas diferentes a la silvestre de TcdE [3]. Durante la purificación con columnas NiNTA, se detectaron proteínas adicionales con bandas de distinto peso molecular. Estas probablemente representan proteínas nativas de *E. coli* que co-purificaron debido a interacciones inespecíficas con cationes divalentes (como Ni^{2+}). Sin embargo, no se observaron contaminantes de tamaño similar a TcdE. Además, el Western Blot confirmatorio mostró claramente la señal correspondiente a TcdE en las fracciones eluidas, lo cual respalda la eficiencia de su purificación bajo las condiciones ensayadas.

Los resultados obtenidos, si bien no confirman una interacción directa robusta, sí permiten establecer una base metodológica para futuras investigaciones. La expresión de TcdE_wt en *E. coli*, su purificación y posterior inmovilización en una matriz sólida, representan avances técnicos que posibilitan su aplicación en sistemas más complejos, donde se evalúen las in-

teracciones bajo condiciones que simulen con mayor fidelidad el entorno intracelular de *C. difficile*. En este sentido, se propone ampliar los estudios para incluir otras isoformas de TcdE, así como realizar ensayos con diferentes subtipos de TcdB, idealmente en condiciones que involucren vesículas de membrana o modelos celulares.

Además, el gen *tcdE* posee un marco abierto de lectura que codifica para tres posibles codones de iniciación que pueden resultar en la traducción de tres isoformas distintas de la proteína TcdE. Hay tres potenciales metioninas en las posiciones: 1, 25 y 27 que se presume traducen al menos tres isoformas de manera simultánea [3]. Es esperable entonces, que se detectara más de una banda en el Western Blot y este resultado se obtuvo sólo cuando se sometió el purificado proteico a más de un agente reductor de origen químico y físico. En las demás ensayos, sólo se obtuvo una banda cercana a un peso molecular de 19 KDa, y ante esto se podría hipotetizar que la interacción evaluada en el presente trabajo fue con la TcdE silvestre.

Adicionalmente, se han descrito al menos 12 subtipos de TcdB con variaciones en su estructura lo cual sugiere la importancia de evaluar la interacción bioquímica de TcdE con diferentes subtipos de TcdB [18,20].

Conclusiones

Finalmente, este trabajo aporta evidencia preliminar sobre una interacción potencial entre TcdE y TcdB, aunque de baja intensidad, y destaca la importancia de explorar de forma más profunda los mecanismos moleculares que permiten la secreción de las toxinas en *C. difficile*. El hecho de que estas cepas epidémicas acumulen toxina intracelular y expresen de forma activa TcdE indica que existe un sistema regulado de secreción que aún no se comprende en su totalidad. Aclarar este mecanismo no solo tiene implicaciones básicas en la biología y patogénesis de *C. difficile*, sino también aplicaciones clínicas, ya que podría abrir el camino al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a interferir con la liberación de toxinas y reducir la virulencia bacteriana.

Referencias

- [1] **Kordus SL, Thomas AK, Lacy DB.** Clostridioides difficile toxins: mechanisms of action and antitoxin therapeutics. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20:285–298. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00660-2>
- [2] **Monot M, Eckert C, Lemire A, Hamiot A, Dubois T, Tessier C, et al.** Clostridium difficile: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus. *Sci Rep.* 2015;5:15023. <https://doi.org/10.1038/srep15023>
- [3] **Govind R, Fitzwater L, Nichols R.** Observations on the role of TcdE isoforms in Clostridium difficile toxin secretion. *J Bacteriol.* 2015;195(15):2600–2609. <https://doi.org/10.1128/JB.00224-15>
- [4] **Martin-Verstraete I, Peltier J, Dupuy B.** The regulatory networks that control Clostridium difficile toxin synthesis. *Toxins.* 2016;8(5):153. <https://doi.org/10.3390/toxins8050153>
- [5] **Tan KS, Wee BY, Song KP.** Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of Clostridium difficile. *J Med Microbiol.* 2001;50(7):613–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-7-613>
- [6] **Govind R, Dupuy B.** Secretion of Clostridium difficile toxins A and B requires the holin-like protein TcdE. *PLoS pathogens.* 2012;8(6):e1002727. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002727>
- [7] **Reddy BL, Saier Jr MH.** Topological and phylogenetic analyses of bacterial holin families and superfamilies. *Biochimica Biophysica Acta.* 2013;1828(11):2654–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2013.07.004>
- [8] **Kempher ML, Shadid TM, Larabee JL, Ballard JD.** A sequence invariable region in TcdB2 is required for toxin escape from Clostridioides difficile. *J Bacteriol.* 2024;18:e00096–24. <https://doi.org/10.1128/jb.00096-24>
- [9] **Olling A, Seehase S, Minton NP, Tatge H, Schröter S, Kohlscheen S, et al.** Release of TcdA and TcdB from Clostridium difficile cdi 630 is not affected by functional inactivation of the tcdE gene. *Microbial pathogenesis.* 2012;52(1):92–100. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.10.009>
- [10] **Hundsberger T, Braun V, Weidmann M, Leukel P, Sauerborn M, Von Eichel-Streiber C.** Transcription analysis of the genes tcdA-E of the pathogenicity locus of Clostridium difficile. *Euro J Biochem.* 1997;244(3):735–42. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00735.x>
- [11] **Cartman ST, Heap JT, Kuehne SA, Cockayne A, Minton NP.** The emergence of ‘hypervirulence’ in Clostridium difficile. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(6):387–95. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.09.004>
- [12] **Merrigan M, Venugopal A, Mallozzi M, Roxas B, Viswanathan VK, Johnson S, et al.** Human hypervirulent Clostridium difficile strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production. *J Bacteriol.* 2010;192(19):4904–11. <https://doi.org/10.1128/jb.00445-10>
- [13] **Quesada-Gómez C, López-Ureña D, Acuña-Amador L, Villalobos-Zúñiga M, Du T, Freire R, et al.** Emergence of an outbreak-associated Clostridium difficile variant with increased virulence. *J Clin Microbiol.* 2015;53(4):1216–26. <https://doi.org/10.1128/JCM.03058-14>
- [14] **Badilla-Jiménez I, Quesada-Gómez C.** Detección de toxinas A y B intracelulares en genotipos epidémicos de Clostridioides difficile. *Hechos Microbiológicos.* 2021;12(1):11–7. <https://doi.org/10.17533/10.17533/udea.hm.v12n1a02>
- [15] **Lanis JM, Hightower LD, Shen A, Ballard JD.** TcdB from hypervirulent Clostridium difficile exhibits increased efficiency of autoprocessing. *Mol Microbiol.* 2012;84(1):66–76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08009.x>
- [16] **Bolanos-García VM, Davies OR.** Structural analysis and classification of native proteins from E. coli commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochimica Biophysica Acta.* 2006;1760(9):1304–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.03.027>
- [17] **Govind R, Dupuy B.** Secretion of Clostridium difficile Toxins A and B Requires the Holin-like Protein TcdE. *PLOS Pathogens* 2012;8(6): e1002727. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002727>
- [18] **Tian S, Xiong X, Zeng J, Wang S, Tremblay BJ, et al.** Identification of TFPI as a receptor reveals recombination-driven receptor switching in Clostridioides difficile toxin B variants. *Nature Comm.* 2022;13(1):6786. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33964-9>
- [19] **Mondhe M, Chessher A, Kuehne SA, Minton NP, Heap JT.** The Clostridioides difficile cell wall protein CwpV mediates phase-variable adhesion to host cells. *J Biol Chem.* 2021;296:100926. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100926>
- [20] **Hargreaves KR, Thanki AM, Blakely GW, Clokie MRJ.** Phylogenomics of 8,839 Clostridioides difficile genomes reveals recombination-driven evolution and diversification of toxin A and B. *PLoS Pathog.* 2021;17(1):e1009181. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009181>